

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta
Katedra fyziologie živočichů



BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
SUPRACHIASMATICKÁ JÁDRA JAKO DENNÍ HODINY
A KALENDÁŘ
THE SUPRACHIASMATIC NUCLEI AS A DAILY CLOCK
AND CALENDAR

Dominika Pačesová

Školitel: PharmDr. Alena Sumová, DrSc.

Praha 2011

Ráda bych poděkovala své školitelce PharmDr. Aleně Sumové DrSc. za trpělivost, ochotu pomoci a cenné rady při psaní této práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za podporu a povzbuzování nejen při psaní této práce, ale během celého studia.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Suprachiasmatická jádra jako denní hodiny a kalendář“ vypracovala samostatně, s použitím uvedené literatury a na základě konzultací se svou školitelkou.

V Praze dne 12. 8. 2011

Dominika Pačesová

ABSTRAKT

Suprachiasmatická jádra (SCN) jsou sídlem centrálního oscilátoru savců, zodpovědného za kontrolu a koordinaci cirkadiánních rytmů v celém těle. Jedná se o párovou strukturu v hypothalamu, umístěnou těsně nad křížením optických nervů a sestávající z cca 20 000 neuronů. SCN mají díky svým specifickým vlastnostem výjimečné postavení v rámci cirkadiánního systému. Jsou spojena přímou drahou s retinou a přijímají tak informace o světelných změnách v okolním prostředí. Jednotlivé SCN neurony jsou nezávislými autonomními oscilátory, které jsou propojeny v komunikační síť. Díky této síti dochází k vzájemné synchronizaci mezi neurony uvnitř SCN, což umožňuje zvýšení přesnosti a robustnosti oscilátoru. Cílem práce je shrnout poznatky o struktuře a funkci SCN, a to jak na úrovni jednotlivých buněk, subpopulací buněk, až na úroveň celého jádra. Specifickým cílem práce je souhrn faktorů, které determinují jejich centrální úlohu v cirkadiánním systému.

Klíčová slova: suprachiasmatická jádra, cirkadiánní systém, synchronizace

ABSTRACT

The suprachiasmatic nuclei (SCN) harbor the master circadian pacemaker in mammals which is responsible for control and coordination of circadian rhythms throughout the body. They are a paired structure in the hypothalamus, located just above the optic chiasm, consisting of approximately 20 000 neurons. Due to their specific properties, the SCN have a unique position within the circadian system. They are connected with retina and, therefore, they can directly receive information about changes in external light/dark cycle. The individual SCN neurons are independent autonomous circadian oscillators which are interconnected in a communication network. This network allows the individual SCN oscillators to synchronize among each other and thus to increase the precision and robustness of the oscillations. This work is focused to summarize the knowledge on the structure and function of the SCN at the level of single cells, subpopulations of cells and the whole SCN. The specific goal of this work is a summary of the factors that determine their central role within the circadian system.

Keywords: suprachiasmatic nuclei, circadian system, synchronization

SEZNAM ZKRATEK

AA-NAT	Arylalkylamine N-acetyltransferasa
AMPA	α -amino-3hydroxy-5methyl-4-isoxazolepropionová kyselina
AVP	Arginin vasopresin
BMAL1	Brain and muscle Amt-like protein
c-fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
CG	Clock genes, hodinové geny
CK1 δ	Kasein kináza delta
CK1 ϵ	Kasein kináza1 epsilon
Clock	Circadian locomotor output cycles kaput
CRE	Calcium/cAMP response element
CREB	Calcium/cAMP response element binding protein
Cry1, Cry2, CRY	Cryptochrom 1, 2
DM	Dorzomediální
DMH	Dorzomediální hypothalamus
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GABA _A	Receptor pro γ -aminomáselnou kyselinu
GHT	Genikulo-hypotalamický trakt
GRP	Gastrin-releasing peptid, gastrin uvolňující peptid
IGL	Intergeniculate leaflet, intergenikulární lístek
LUC	Luciferáza
MEA	Micro electrode array

mRNA	Mediátorová ribonukleová kyselina
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NPAS2	Neuronal PAS domain protein 2
NPY	Neuropeptid Y
OC	Optic chiasma, křížení optických nervů
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptid
Per 1, Per2, PER	Period 1, 2
PVN	Paraventricular nucleus, paraventrikulární jádro
RGCs	Retinal ganglion cells, retinální gangliové buňky
RHT	Retino-hypotalamický trakt
SCN	Suprachiasmatická jádra
sPVZ	Subparaventrikulární zona
TTX	Tetrodotoxin
VIP	Vasoaktivní intestinální polypeptid
Vipr2	Gen pro VPAC2 receptor
VL	Ventrolaterální

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
2. ORGANIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU	3
3. CENTRÁLNÍ HODINY	4
3.1 LOKALIZACE CENTRÁLNÍCH HODIN	4
3.1.1 EXPERIMENTÁLNÍ DŮKAZY PROKAZUJÍCÍ ÚLOHU SCN JAKO CENTRÁLNÍHO PACEMAKERU...	4
3.2 FUNKCE CENTRÁLNÍCH HODIN.....	5
3.3 STRUKTURA CENTRÁLNÍCH HODIN	5
4. OSCILACE NA ÚROVNI JEDNOTLIVÝCH BUNĚK.....	7
4.1 AUTONOMIE BUNĚČNÝCH OSCILÁTORŮ V SCN	7
4.2 BUNĚČNÉ OSCILÁTORY MIMO SCN	8
4.3 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS ZAJIŠŤUJÍCÍ FUNKCI CIRKADIÁNNÍCH HODIN	8
4.3.1 HODINAMI ŘÍZENÉ GENY.....	11
5. OSCILACE NA ÚROVNI SUBPOPULACE NEURONŮ.....	12
5.1 SUBPOPULACE NEURONŮ UVNITŘ SCN	12
6. OSCILACE NA ÚROVNI SÍTĚ NEURONŮ.....	13
6.1 NEURONY V SCN JSOU VZÁJEMNĚ PROPOJENÉ	13
7. KOMPENZAČNÍ MECHANISMY V SCN.....	14
8. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU	16
8.1 INTERNÍ SYNCHRONIZACE SCN.....	16
8.2 EXTERNÍ SYNCHRONIZACE SCN	19
8.3 SYNCHRONIZACE OSCILÁTORŮ V TĚLE.....	21
8.3.1 NEURONÁLNÍ VÝSTUPNÍ DRÁHY	21
8.3.2 HUMORÁLNÍ VÝSTUPY.....	23
9. ZÁVĚR	25
10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	27

1. ÚVOD

U všech živých organismů se mnohé děje pravidelně opakují s periodou v řádu několika milisekund až mnoha let, tj. vykazují takzvané biologické rytmy.

V závislosti na délce periody je dělíme na ultradiánní (perioda je významně kratší než 24 hodin), infradiánní (perioda je podstatně delší než 24 hodin) a cirkadiánní (perioda je zhruba 24 hodin).

Pojmenování cirkadiánní, z latiny circa = přibližně a dies = den, nám napovídá, že délka periody je pouze přibližně rovna 24 hodinám.

Cirkadiánní rytmy jsou rytmy endogenní, vrozené a probíhají i ve zcela neperiodickém prostředí, například ve stálé tmě. Cirkadiánní hodiny, které tyto rytmy pohánějí, tzv. „volně běží v čase“, a řídí tak rytmy se svou vnitřní geneticky a druhově specifickou periodou, označovanou tau. Při „volném běhu“ je cirkadiánní den rozdělen na část subjektivního dne a subjektivní noci.

Během evoluce se cirkadiánní rytmy vyvinuly jako adaptace na periodické změny ve vnějším prostředí, které souvisí se střídáním dne a noci v důsledku otáčení Země kolem své osy. Lze je pozorovat u většiny organismů napříč rostlinnou a živočišnou říší, včetně savců a člověka. Můžeme je měřit na úrovni jednotlivých buněk, tkání a orgánů i organismu jako celku.

K udržování těchto rytmů je v organismu přítomen tzv. cirkadiánní systém, který je u savců organizován četnými hierarchicky uspořádanými oscilátory, které generují rytmický signál. Centrální oscilátor v mozku řídí behaviorální a neurohumorální rytmy na úrovni celého organismu a současně synchronizuje oscilátory umístěné v periférii.

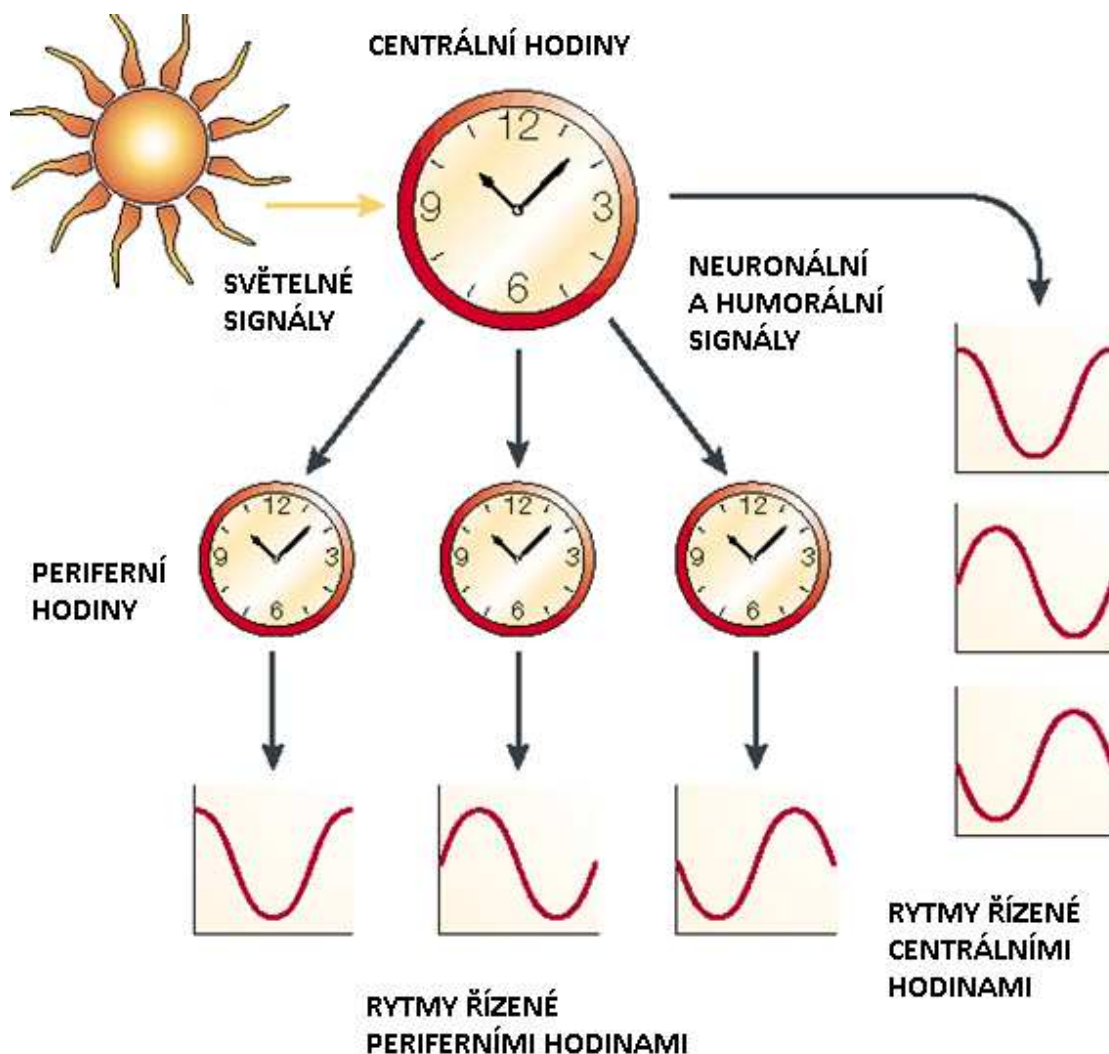
Pro dokonalé fungování celého systému musí být jednotlivé cirkadiánní oscilátory v těle synchronizovány vzájemně mezi sebou a také s vnějším 24 hodinovým dnem. Nejsilnějším synchronizátorem cirkadiánního systému je pravidelné střídání světla a tmy, především prostřednictvím působení světla na tento systém. Světlo nastavuje fázi centrálních hodin a ty pak následně synchronizují do správné fáze periferní oscilátory.

Kromě toho jsou centrální hodiny schopny měnit svůj funkční stav také v závislosti na délce dne, která se během roku mění, tj. na fotoperiodě. Centrální hodiny tak hrají hlavní úlohu při každodenní koordinaci časové regulace fyziologických procesů s vnějším proměnlivým prostředím.

Tato práce se zaměřuje právě na tyto centrální hodiny, které jsou u savců uloženy v hypothalamu. Bude se věnovat jejich struktuře a funkci, a to jak na úrovni jednotlivých buněk, subpopulací buněk, až na úroveň celého jádra. Specifickým cílem práce je souhrn faktorů, které determinují jejich centrální úlohu v cirkadiánním systému.

2. ORGANIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

Cirkadiánní systém savců má komplexní strukturu a zahrnuje 4 základní části: 1) centrální pacemaker v mozku, 2) periferní hodiny v každé jednotlivé buňce těla, 3) vstupní cesty, jimiž je centrální pacemaker synchronizován s vnějším prostředím a 4) cesty výstupní, ať již nervové či humorální, pomocí nichž je rytmický signál přenášen na periferii (Leak & Moore, 2001).



Obrázek číslo 1: Schematické znázornění cirkadiánního systému (Cermakian & Sassone-Corsi, 2000).

3. CENTRÁLNÍ HODINY

3.1 LOKALIZACE CENTRÁLNÍCH HODIN

Suprachiasmatická jádra (SCN) v hypotalamu byla identifikována jako sídlo centrálních cirkadiánních hodin savců přibližně před 40 lety, a to současně a nezávisle na sobě ve dvou laboratořích, vedených R. Y. Moorem (Moore & Lenn, 1972) a I. Zuckerem (Stephan & Zucker, 1972).

3.1.1 EXPERIMENTÁLNÍ DŮKAZY PROKAZUJÍCÍ ÚLOHU SCN JAKO CENTRÁLNÍHO PACEMAKERU

Nezbytnost a dominance SCN pro cirkadiánní rytmicitu byla prokázána pomocí izolačních (Inouye & Kawamura, 1979), destrukčních (Stephan & Zucker, 1972) a transplantačních pokusů (Lehman et al, 1987; Ralph et al, 1990).

3.1.1.1 IZOLAČNÍ EXPERIMENT

V tomto experimentu byla izolována malá oblast hypotalamu, obsahující SCN, od všech neuronálních vstupů a výstupů, a přitom byla ponechána anatomicky netknutá *in situ*. Pomocí dvou elektrod, z nichž jedna byla umístěna do SCN a druhá do různých oblastí mozku, byla zaznamenávána rytmická aktivita neuronů. Výsledkem bylo zjištění, že v případě zachování intaktních spojů SCN, byla naměřena rytmicita ve všech měřených oblastech mozku, zatímco v případě izolace „ostrůvku“ hypotalamu obsahujícího SCN od ostatních oblastí mozku, zůstala rytmicita zachována pouze v SCN, zatímco v ostatních oblastech mozku vymizela (Inouye & Kawamura, 1979).

3.1.1.2 DESTRUKČNÍ EXPERIMENTY

Tyto experimenty ukázaly, že totální poškození (Stephan & Zucker, 1972), nebo chirurgické odstranění SCN (Stephan & Zucker, 1972) způsobilo ztrátu cirkadiánní rytmicity řady funkcí v těle, např. v pohybové aktivitě, tělesné teplotě, sekreci hormonů apod. (Stephan & Zucker, 1972).

3.1.1.3 TRANSPLANTAČNÍ EXPERIMENTY

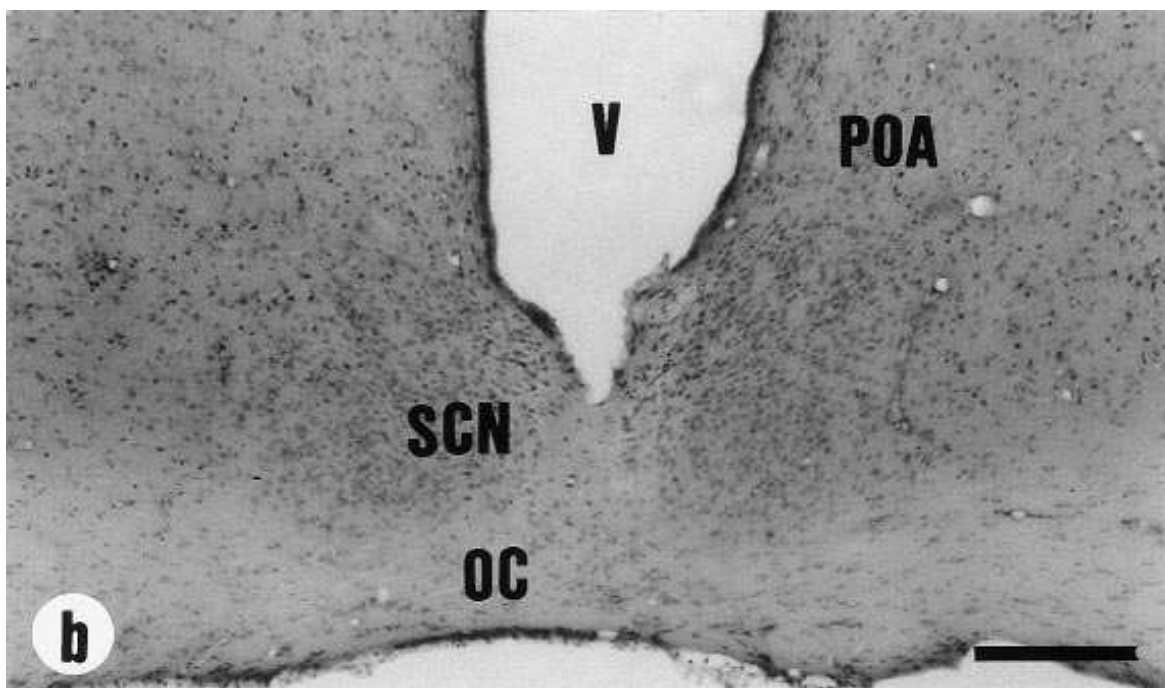
Bylo zjištěno, že transplantací fetálních SCN příjemci, jemuž byla dříve SCN odstraněna, může být obnovena ztracená cirkadiánní rytmicita (Lehman et al, 1987). V dalších pokusech bylo prokázáno, že transplantací SCN se z dárce na příjemce přenáší i délka periody rytmů. K těmto pokusům byli použiti mutanti Syrského křečka s výrazně kratší, cirkadiánní periodou (tzv. Tau mutace) (Ralph et al, 1990).

3.2 FUNKCE CENTRÁLNÍCH HODIN

Hlavní funkcí SCN savců je generovat a udržovat cirkadiánní signál s periodou blízkou 24 hodinám, a to i ve stálém neperiodickém prostředí, a koordinovat cirkadiánní behaviorální a fyziologické procesy. V podmínkách střídání dne a noci jsou SCN schopna synchronizovat svou rytmicitu s periodou solárního dne. Vnitřní hodiny umožňují organismu předvídat změny prostředí a synchronizovat se s nimi. SCN jsou na vrcholu hierarchického uspořádání cirkadiánního systému, protože synchronizují ostatní periferní hodiny uložené v mozku a v různých tkáních a orgánech v těle (Herzog et al, 2004).

3.3 STRUKTURA CENTRÁLNÍCH HODIN

SCN jsou párová jádra, sestávající u savců z přibližně 20 000 nervových buněk. Nacházejí se v anteroventrální části hypotalamu, přímo nad křížením optických nervů a po obou stranách třetí mozkové komory (Klein et al, 1991). Umístění SCN je strategické z hlediska možnosti příjmu informací z vnitřního prostředí pomocí mediátorů v mozkomíšním moku ve třetí mozkové komoře a z hlediska příjmu informací z vnějšího prostředí, tj. světelných signálů z retiny.



Obrázek číslo 2: Snímek suprachiasmatických jader ze světelného mikroskopu. (SCN- suprachiasmatická jádra, OC- křížení optických nervů, V- třetí mozková komora, POA- preoptická oblast) (Ibata et al, 1999).

Neurony SCN jsou heterogenní a liší se ve velikosti, tvaru, aferentních a eferentních spojeních, fenotypu neuropeptidů či funkci (Abrahamson & Moore, 2001; Yan et al, 1999).

Spolu s neurony jsou v SCN přítomny i glie, zejména astrocyty (Prolo et al, 2005). Neurony a glie jsou na sobě metabolicky závislé a mají komplementární funkci. Glie jsou ve větší koncentraci přítomny v retinorecipientní části SCN. Astrocyty vykazují, podobně jako neurony, cirkadiální rytmy v expresi hodinových genů (Prolo et al, 2005) (Viz kapitola 4.3.). Komunikace mezi astrocyty a neurony je zřejmě zprostředkována pomocí štěrbinových spojů („gap junctions“) (Tamada et al, 1998).

4. OSCILACE NA ÚROVNI JEDNOTLIVÝCH BUNĚK

4.1 AUTONOMIE BUNĚČNÝCH OSCILÁTORŮ V SCN

Neurony v SCN vykazují autonomní, nezávislé cirkadiánní rytmy v elektrické aktivitě a expresi genů, které přetrvávají i v konstantních podmínkách (Liu et al, 2007; Welsh et al, 1995).

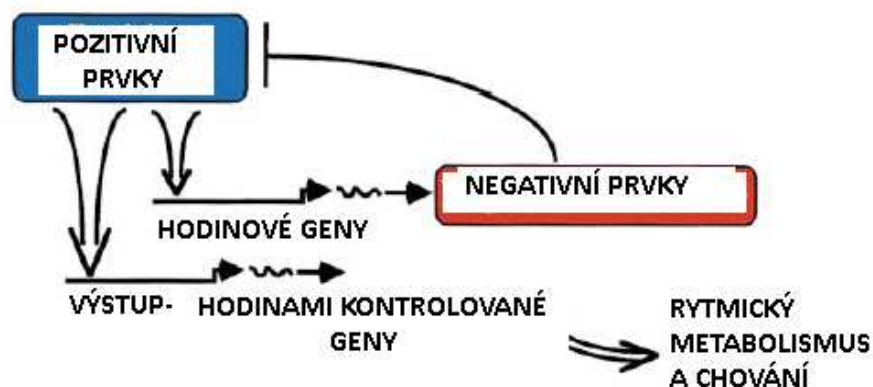
Dlouhou dobu nebylo jasné, zda je cirkadiánní rytmicita generována samostatnými suprachiasmatickými neurony, nebo zda vychází ze specifické struktury mezibuněčných spojení uvnitř SCN. S využitím metody „Multielectrode array“ („multielektrodoých destiček“) byly neurony SCN studovány v disperzní kultuře s velmi nízkou hustotou, kde se po dobu několika dnů až týdnů pomocí mikroelektrod zaznamenávaly spontánní akční potenciály z jednotlivých buněk, které byly fixovány na skleněné destičce. Bylo zjištěno, že buňky ve stejné kultuře generují rytmy v pálení akčních potenciálů s odlišnou fází i odlišnou periodou a to nezávisle na vzájemné vzdálenosti (Welsh et al, 1995). Zdálo se, že buňky oscilují nezávisle. Limitací této studie bylo to, že mohla být monitorována jen malá část buněk v kultuře. Zůstávalo otázkou, jestli nezůstala neodhalena nějaká synchronizovaná skupina buněk, jejíž rytmicita je zajištěna vzájemnými propojeními. V dalším pokusu autoři použili techniku bioluminiscenčního zobrazení k monitorování cirkadiánních rytmů v expresi genů (Welsh, 2005). Tato metoda je založena na tom, že promotor genu (zde hodinového genu *Per2*- viz níže) řídí transkripci genu reportérového. V tomto případě byla použita transgenická myš PER2::LUC, kde je reportérovým genem gen pro luciferázu. Dochází tedy k rytmické expresi luciferázy a je snímána její aktivita. Tato technika umožňuje sledovat cirkadiánní oscilace ve všech buňkách ve vymezené oblasti v kultuře. David Welsh s kolegy v obou těchto pokusech zjistili, že fáze jednotlivých buněk jsou distribuovány náhodně a buňky v malé vzdálenosti od sebe nemají podobnější fázi ani periodu. V dalším nezávislém pokusu, ve kterém byly monitorovány izolované rytmující neurony, také pomocí bioluminiscence (viz předchozí pokus), byla část neuronů z kultury mechanicky odstraněna. Výsledky ukázaly, že 3 z 5 izolovaných neuronů zůstaly rytmickými. Bylo tak jasně dokázáno, že buňky nepotřebují vstupní informace z jiných buněk, aby byly schopné samy oscilovat (Webb et al, 2009).

4.2 BUNĚČNÉ OSCILÁTORY MIMO SCN

Snad jakákoli buňka z těla savců, inkubovaná *in vitro*, vykazuje po určitou dobu cirkadiánní rytmy, dokonce i fibroblasty (Yamazaki et al, 2000). Rodina hodinových genů (viz následující kapitola) je exprimována ve všech buňkách v těle. V konstantních podmínkách byly rytmy v explantátech z periferních tkání částečně nebo úplně utlumeny a došlo k postupné desynchronizaci mezi buňkami. Podobně, jako je tomu u SCN buněk v disperzní kultuře (Welsh et al, 1995), periferní buňky se rozcházejí v periodách i fázích. Z toho vyplývá, že jim chybí funkční propojení. Zatímco explantáty SCN oscilují po dobu několika týdnů i měsíců (Yamazaki et al, 2000). Periferní oscilátory jsou závislé na příjmu synchronizačních signálů ze SCN. Jsou sice schopné generovat rytmy, ale bez signálů ze SCN postupně desynchronizují (Yoo et al, 2004). Jejich rytmy se typicky o několik hodin zpožďují oproti SCN. Výjimku v periférii tvoří u savců retina a olfaktorické bulby, které jsou autonomními periferními oscilátory a oscilace u nich přetrvávají i bez vlivu SCN (Abraham et al, 2005; Tosini & Menaker, 1996).

4.3 MOLEKULÁRNÍ MECHANISMUS ZAJIŠŤUJÍCÍ FUNKCI CIRKADIÁNNÍCH HODIN

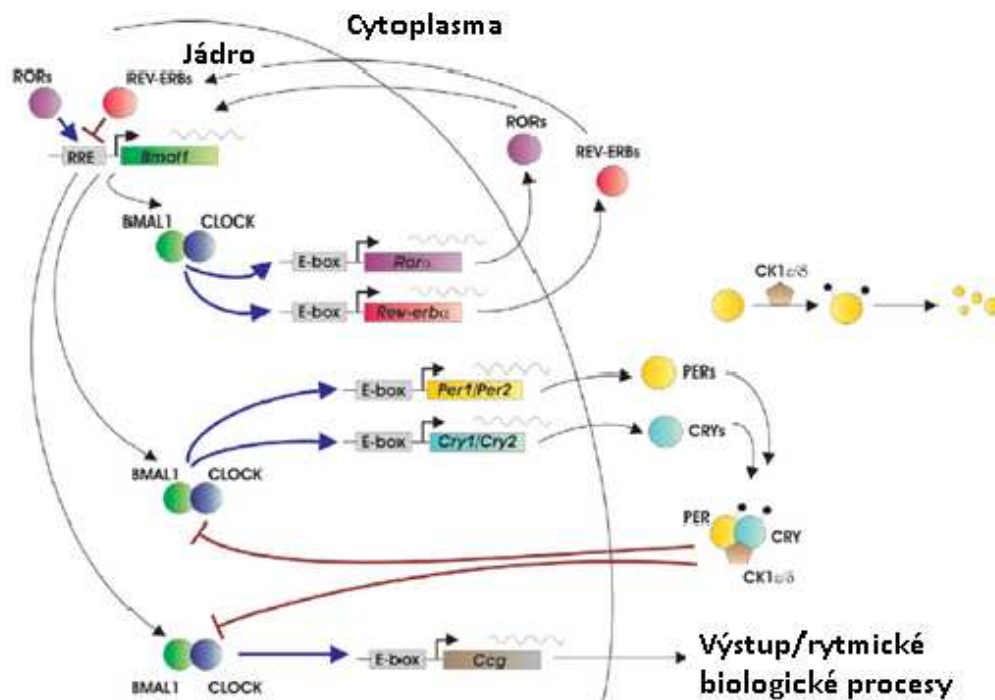
Cirkadiánní signál vzniká na úrovni jedné buňky. Podstata mechanismu generujícího a udržujícího endogenní cirkadiánní rytmy spočívá v autoregulačních transkripčně-translačních zpětnovazebných smyčkách, kterých se účastní sada tzv. hodinových genů a jejich proteinových produktů (Reppert & Weaver, 2001). Molekulární mechanismus generující cirkadiánní signál je podobný v centrálních a periferních hodinách (Nagoshi et al, 2004). Základ mechanismu zpětnovazebných transkripčně-translačních smyček je schematicky znázorněn na obrázku číslo 3.



Obrázek číslo 3: Schéma společných prvků tvořících základ cirkadiánní oscilační smyčky (Dunlap, 1999).

U savců bylo dosud identifikováno několik hodinových genů: *Clock* („*Circadian locomotor output cycles kaput*“), *Bmal1* („*Brain and muscle Arnt-like protein 1*“), *Per1*, *Per2* („*Period*“), *Cry1*, *Cry2* („*Cryptochrome*“), CK1ε („*Casein kináza 1 epsilon*“), *Rev-erb alfa* („*Retinoic acid-related orphan receptor α*“) a *Rora* (Reppert & Weaver, 2001). Transkripty a proteinové produkty těchto genů tvoří vzájemně propojené negativní a pozitivní zpětnovazebné transkripčně-translační smyčky. Výsledkem působení smyček je rytmická regulace exprese většiny z těchto hodinových genů (Shearman et al, 2000). Molekulární smyčky zahrnují transkripční represory, tj. proteiny CRY1, CRY2, PER1, PER2 a REV-ERB alfa a transkripční aktivátory BMAL1 a CLOCK a RORA. Heterodimer BMAL1:CLOCK aktivuje transkripci genů *Per* a *Cry*. Hladiny proteinů PER a CRY v cytoplasmě stoupají a jakmile dosáhnou dostatečně vysoké koncentrace, vytváří komplexy, heterodimery, které vstupují do jádra. V jádře působí jako negativní element zpětnovazebné smyčky, protože se váží na heterodimer CLOCK:BMAL1 navázaný na promotoru svých vlastních genů a tím inhibují jejich transkripci. Tento mechanismus zpětnovazebných smyček generuje cirkadiánní oscilace v expresi genů *Per* a *Cry*. Heterodimer CLOCK:BMAL1 aktivuje také transkripci genu *Rev-erb alfa*. Protein REV-ERB α se pak váže na promotor genu *Bmal1* a tím inhibuje jeho transkripci. O vazbu na promotor *Bmal1* kompetuje s proteinovým produktem genu *Rora*, který je konstitutivně přítomný a transkripci genu *Bmal1* naopak aktivuje (Guillaumond et al, 2005).

Výsledkem je rytmus v expresi genu *Bmal1*, který je v protifázi k rytmu v transkripci genů *Per* a *Cry* (Preitner et al, 2002). Udržení chodu smyček v protifázi je podstatou udržení robustnosti mechanismu.



Obrázek číslo 3: Síť transkripčně-translačních zpětnovazebných smyček tvořících savčí cirkadiánní hodiny- popis obrázku viz text (Ko & Takahashi, 2006).

Aby mechanismus vykazoval cirkadiánní periodu, musí být ovlivněna rychlost opakování smyčky, tj. její perioda. Přibližně 24 hodinové trvání smyčky je zajištěno posttranslačními modifikacemi (fosforylace, ubiquitinace aj.) a řízenou proteinovou degradací. Maximální hladiny proteinů jsou posunuty oproti maximálním hladinám transkriptů o několik hodin. Během subjektivního dne je vysoká hladina mRNA hodinových genů a nízká hladina proteinů. Během subjektivní noci je tomu naopak. Hladina proteinů v cytoplasmě je ovlivňována řízenou degradací. PER proteiny jsou fosforylovány kasein kinázou 1 epsilon (CK1ε) nebo delta (CK1δ) a tím připravovány pro degradaci v proteazomu (Akashi et al, 2002). Díky této degradaci se prodlužuje doba, kdy je dosaženo mezní hodnoty v akumulaci proteinů pro přestup do jádra.

Důležitost této posttranslační modifikace byla prokázána mutací kasein kináz, při níž došlo ke zkrácení cirkadiánní periody u savců (tzv. Tau mutant) (Lowrey et al, 2000). Stabilitu proteinů CRY zajišťuje protein FboxL3, který je součástí degradačního ubiquitinligázového komplexu. Mutace genu *Overtime*, jejímž důsledkem je ztráta funkce FboxL3, má za následek, že CRY tak není degradován. Následkem toho dochází k prodloužení inhibice aktivačního komplexu CLOCK:BMAL1 a tím k prodloužení periody. U homozygotního mutantu tohoto genu je perioda prodloužena až na 26 hodin (Siepka et al, 2007).

4.3.1 HODINAMI ŘÍZENÉ GENY

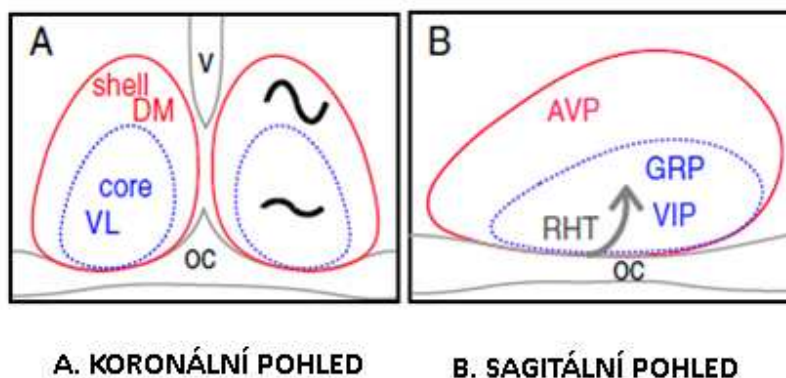
Molekulový hodinový mechanismus řídí rytmicky transkripci mnoha genů se specifickými buněčnými funkcemi, tzv. hodinami řízených genů. Tyto geny obsahují ve svých promotorech vazebné místo (E-box), na které se mohou vázat produkty hodinových genů, a tak jejich transkripci rytmicky aktivovat. Produkty těchto genů nejsou nezbytné pro mechanismus zpětnovazebných smyček. Prostřednictvím těchto genů vysílají transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky časové signály v SCN neuronech, které jsou přenášeny dále do mozku a těla. Podobně je signál přenášen i v periferních orgánech, kde se hodinami řízené geny a jejich časové vzory liší v závislosti na typu tkáně (Panda et al, 2002; Storch et al, 2002).

5. OSCILACE NA ÚROVNI SUBPOPULACE NEURONŮ

5.1 SUBPOPULACE NEURONŮ UVNITŘ SCN

Na základě struktury a funkce jsou v SCN rozlišovány 2 hlavní části, neboli subpopulace neuronů (Abrahamson & Moore, 2001; Moore, 1996). Jedná se o ventrolaterální část (VL), označovanou jako jádro (z angl. „core“) a dorsomediální část (DM), označovanou jako obal (z angl. „shell“). Obě části SCN jsou znázorněny na obrázku číslo 4.

Obrázek číslo 4: Anatomické a funkční rozdělení SCN podoblastí, koronální pohled (Yan, 2009).



Schématické zobrazení DM- dorzomediální „shell“ a VL- ventrolaterální „core“ oblasti, OC- křížení optických nervů, V- třetí mozková komora, RHT- retino-hypotalamický trakt, GRP- gastrin uvolňující peptid, VIP- vasoaktivní intestinální polypeptid, AVP- neuropeptid argininvasopresin

VL část SCN se nachází v těsné blízkosti křížení optických nervů, je tak vhodně umístěna pro přijímání informací z retiny, a je přímo ovlivňována světlem (Levine et al, 1991). Přijímá i nesvětelné podněty pomocí dalších drah vedoucích z ostatních částí mozku (Moga & Moore, 1997). (O vstupních drahách bude blíže pojednáno v kapitole 8.2.) Je zásadní pro udržování propojení a synchronizaci uvnitř SCN (LeSauter & Silver, 1999). Neurony v této části SCN obsahují vasoaktivní intestinální polypeptid (VIP) a gastrin uvolňující peptid (GRP) (Moga & Moore, 1997).

Buňky v DM části, která obklopuje retinorecipientní část SCN, jsou menší a více nahuštěné na sobě, než neurony ve VL části. Přijímají informace jednak z VL části a jednak z ostatních oblastí mozku, jako například z jader mozkového kmene, či limbických oblastí (Moga & Moore, 1997). Neurony DM části vytvářejí spontánní rytmické oscilace v aktivitě a v expresi hodinových genů s vysokou amplitudou během subjektivního dne. Je zde rytmicky syntetizován neuropeptid argininvasopresin (AVP) (Moga & Moore, 1997). Obě části pak obsahují neurotransmitter kyselinu γ -aminomáselnou (GABA).

Funkční odlišnosti existují i v subpopulacích podél rostro-kaudální osy. Rytmy v rostrální, mediální a kaudální části SCN se fázově liší a to v závislosti na fotoperiodě (Viz kapitola 8.2.) (Sosniyenko et al, 2010).

6. OSCILACE NA ÚROVNI SÍTĚ NEURONŮ

6.1 NEURONY V SCN JSOU VZÁJEMNĚ PROPOJENÉ

Neurony v SCN jsou propojeny komunikační sítí, která jim umožňuje vytvářet koherentní, rytmický výstupní signál, organizující robustní cirkadiánní rytmy v chování a fyziologii. Fázová rozmanitost uvnitř SCN umožňuje flexibilní topograficky rozložené výstupní signály z různých podoblastí SCN, což umožňuje vysílat rozličné signály do odlišných oblastí mozku. Svou amplitudu SCN neurony uzpůsobují v závislosti na vstupech od okolních členů sítě, pracují jako „tým“.

Komunikační síť synchronizuje a posiluje oscilace buněk, zvyšuje preciznost a robustnost signálu. Díky této síti mohou zřejmě silnější oscilátory posilovat oscilace slabších oscilátorů (Herzog et al, 2004) a mohou být kompenzovány případné poruchy uvnitř této sítě (viz dále- Kompenzační mechanismy v SCN). Je třeba říci, že přesný mechanismus, jak jsou jednotlivé oscilátory uvnitř SCN propojeny, není dosud zcela objasněn.

7. KOMPENZAČNÍ MECHANISMY V SCN

Specifickou vlastností SCN, která vymezuje jejich nadřazenou funkci v cirkadiánním systému, je schopnost kompenzovat absenci některých hodinových genů, podílejících se na zpětnovazebných smyčkách generujících cirkadiánní rytmus, a tak posílit či zachovat rytmicitu.

Při pokusech zkoumajících tyto mechanismy, byla sledována rytmicita tkání odebraných zvířatům, u kterých byl některý z hodinových genů mutován nebo vyřazen z funkce. Bylo zjištěno, že funkce genu *Bmal1* je nezastupitelná, jelikož není nijak kompenzován (Bunger et al, 2000). Je-li *Bmal1* vyřazen z funkce, dojde ke ztrátě cirkadiánní rytmicity na behaviorální úrovni (Bunger et al, 2000). Bioluminiscence, měřená v explantátech řezů ze SCN transgenní myši PER2::LUC, byla porovnávána u myší, které měly funkční gen *Bmal1*, či u nich byl tento gen mutován. Překvapivě, v explantátech obsahujících SCN z mutanta, byla objevena přetrvávající, i když variabilní rytmicita. Na rozdíl od toho, ale žádná z periferních tkání odebraných z *Bmal1* mutantní myši, nedokázala cirkadiánní rytmus generovat (Liu et al, 2007).

Pro zjištění významu intercelulárních spojů pro udržení rytmicity explantátů SCN z *Bmal1* mutanta, byla zaznamenávána PER2::LUC bioluminiscence z jednotlivých SCN neuronů v disperzní kultuře. Na rozdíl od řezu obsahujícího SCN, disociované neurony nevykazovaly žádné detekovatelné rytmy. Tím bylo prokázáno, že stochastická rytmicita, pozorovaná v explantátech SCN *Bmal1* mutanta, není buněčně autonomní, ale pochází z interakcí mezibuněčné sítě (Liu et al, 2007). Nedávné pokusy potvrdily, že propojení neuronů SCN v síť, může samo o sobě generovat cirkadiánní rytmus a to i v případě, že jednotlivé oscilátory měly hodiny geneticky vyřazené z funkce (Ko et al, 2010). Tato vlastnost neuronální sítě odhalila dosud nepoznanou úroveň cirkadiánní organizace.

V dalších pokusech byla zkoumána zastupitelnost ostatních hodinových genů.

Na behaviorální úrovni je u myší s mutací genu *Per1*, *Cry1* nebo *Cry2* ovlivněna pouze délka periody, rytmicita zůstává ale zachována.

Při absenci genu *Per2* dochází k ještě většímu zkrácení periody, až arytmicitě (Bae et al, 2001; Liu et al, 2007). Pokud chybí oba *Cry* geny nebo oba *Per* geny, stává se myš zcela arytmicickou (Bae et al, 2001; Liu et al, 2007). NPAS2 je paralogem CLOCK. Byl detekován v předním mozku a jeho přítomnost byla prokázána také v SCN (DeBruyne et al, 2007). Může dimerizovat s BMAL1 a podílet se na hodinovém mechanismu v nepřítomnosti CLOCK (DeBruyne et al, 2007). CLOCK a NPAS2 jsou vzájemně zastupitelné v mozkových strukturách. Chybí-li však oba, výsledkem je arytmicita. V periférii k vzájemné náhradě CLOCK/NPAS2 nedochází.

Bylo zjištěno, že zatímco v explantátech SCN jsou pro zachování rytmicity geny *Per1*, *Cry1* a *Cry2* individuálně postradatelné, jsou na rozdíl od toho, v individuálních neuronech v disperzní kultuře, v explantátech z periferní tkáně či v kultuře fibroblastů tyto geny pro zachování rytmů zcela nezbytné (Liu et al, 2007).

Výsledky tak naznačují, že schopnost kompenzace je odlišná v řezech obsahujících SCN, v perifériích, ale také u buněk SCN v disperzní kultuře a kultuře fibroblastů (Liu et al, 2007). To, že v SCN může být funkce kompenzována, je umožněno díky různým mechanismům. Tyto mechanismy chybí v periférii a u dispergovaných buněčných kultur. Některé hodinové geny jsou ve své funkci zastupitelné, jiné jsou nenahraditelné. Existence paralogů je jedním z mechanismů, jak zachovat robustnost hodin. Paralogy se mohou podílet na podpoře oscilací jen při některých genetických odchylkách. Dalším mechanismem je již zmíněná mezibuněčná interakce. Absence těchto kompenzačních mechanismů v dispergovaných SCN neuronech je vysvětlována právě přerušením mezibuněčných spojů. V periferních tkáních, které jsou jiného než neuronálního původu, nejsou jednotlivé oscilátory vzájemně propojeny vůbec. Komunikace mezi buňkami může maskovat ztrátu funkce, která je viditelná u jednotlivých buněk. Propojená SCN síť je odolnější vůči odchylkám, než jednotlivé SCN neurony. Jako celek jsou tedy jádra schopna dosáhnout velmi robustního výstupního signálu.

8. SYNCHRONIZACE CIRKADIÁNNÍHO SYSTÉMU

Synchronizace je pozorována na všech úrovních cirkadiánního systému.

8.1 INTERNÍ SYNCHRONIZACE SCN

V SCN existují funkční směry, ve kterých neurony komunikují a působí na sebe pomocí komunikační sítě. Zásadní úlohu pro udržování propojení uvnitř SCN má oblast „core“.

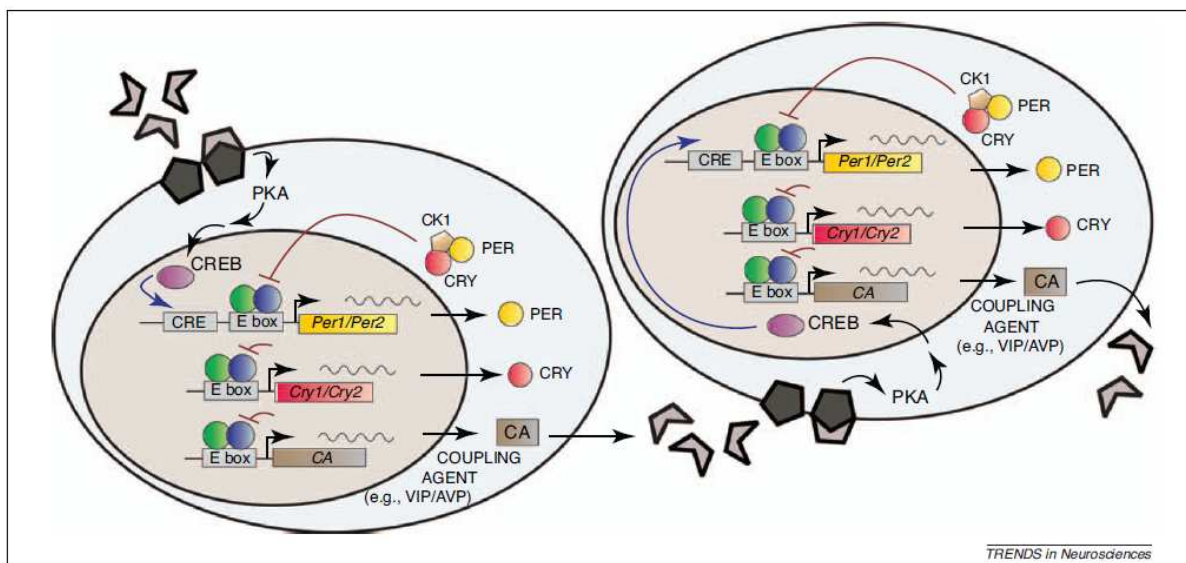
Jak již bylo zmíněno, ne všechny neurony v SCN mají stejnou schopnost generovat rytmy. Díky propojení komunikační sítě se rytmicita vzájemně posiluje a jádra jako celek mohou působit jako silný oscilátor (Herzog et al, 2004).

Na spojování a synchronizaci neuronů v SCN se významně podílejí elektrické a chemické synapse. Mezi signalizační faktory uvnitř SCN patří γ -aminomáselná kyselina (GABA), vasoaktivní intestinální polypeptid (VIP), gastrin uvolňující peptid (GRP) a svůj podíl mají i „gap junctions“.

Neurony jsou synchronizovány pomocí své elektrické aktivity. Tetrodotoxin (TTX), který selektivně a reverzibilně blokuje sodíkové napěťově řízené kanály, čímž inhibuje generování akčního potenciálu, vyvolá přerušení mezibuněčné komunikace uvnitř SCN a desynchronizaci mezi neurony (Yamaguchi et al, 2003). Jednotlivé SCN neurony spolu zřejmě komunikují také prostřednictvím „gap junctions“, jak dokazuje přítomnost proteinu connexin-32, který je jejich součástí (Colwell, 2000).

GABA je nejhojnějším neurotransmiterem a vyskytuje se snad v celém rozsahu SCN (Moore & Speh, 1993). Váže se na GABA_A receptory, které se nalézají po celých SCN. GABA_A receptory vedou svou aktivací k vstupu chloridových iontů do buňky, hyperpolarizaci membrány a vzniku inhibičního postsynaptického potenciálu.

Hlavním komunikačním prvkem uvnitř SCN je vasoaktivní intestinální peptid (VIP) (Aton et al, 2005; Brown et al, 2007). Prostřednictvím vazby na VPAC2 receptor (kodovaný genem *Vipr2*) se podílí na synchronizaci neuronů a na posilování a udržování cirkadiánní rytmicity jednotlivých buněk (Aton et al, 2005). VIP je nejvíce zastoupeným neurotransmiterem ve VL oblasti, kde je rytmicky vylučován. VPAC2 receptor je v SCN hojně exprimován a to hlavně v AVPergních neuronech DM oblasti. Pro zjištění funkcí VIP a VPAC2 receptoru byli studováni mutanti v genech *Vip* a *Vipr2* (Brown et al, 2007). Při ztrátě VIP signalizace se sníží počet rytmických buněk. Aplikace VIP způsobí fázové posuny cirkadiánních rytmů, obdobné těm indukovaným světlem a může obnovit synchronizaci mezi neurony (Nielsen et al, 2002). VIP indukuje expresi *Per* genů přes CREB (viz obrázek číslo 5), a tím seřizuje cirkadiánní rytmy postsynaptických neuronů nezávisle na smyčce (Nielsen et al, 2002). Tato dráha je tedy zahrnuta nejen v mezibuněčné signalizaci, ale i v seřizování SCN světelnými stimuly. VIP může být částečně zastoupen GRP (Aida et al, 2002) nebo PACAP (z angl. „pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide“) (Harmar et al, 2002). Oba se váží, kromě svých specifických receptorů (BB2 a PAC1), také na VPAC2 receptor. Oba jsou zahrnuty ve světelné signalizaci (Aida et al, 2002; Harmar et al, 2002). VPAC2 receptory jsou esenciální jak pro synchronizaci, tak amplitudu cirkadiánních rytmů (Harmar et al, 2002). Neurony bez funkčních VPAC2 receptorů byly zcela desynchronizovány (Harmar et al, 2002). Podání agonisty VPAC2 receptoru ve VIP deficientních neuronech obnoví jejich rytmicitu i synchronizaci (Aton et al, 2005).



Obrázek číslo 5: Intracelulární molekulární hodiny a mezibuněčné signální dráhy (Mohawk & Takahashi, 2011)

Neurony ve VL části přímo odpovídají na světelné signály (Levine et al, 1991). Neurony v DM části vytvářejí spontánní rytmické oscilace a jsou seřizovány neurony z VL části. VL a DM oblast jsou vzájemně fázově posunuty. Při pokusu, ve kterém byly odděleny ventrální a dorzální část SCN bylo prokázáno, že ve VL části zůstala rytmicita zachována a neurony byly vzájemně synchronizovány, zatímco v DM části došlo k jejich desynchronizaci (Yamaguchi et al, 2003). Chyběl jim synchronizační prvek, který přichází z VL části a kterým je zřejmě výlev VIP na synaptických terminálech. Komunikace mezi subpopulacemi buněk v SCN probíhá kromě vymezení na VL a DM oblast i v předozadním rozložení (rostrální, mediální a kaudální). Komunikace neuronů v rostro-kaudálním rozložení se zdá být významná pro kódování fotoperiody (Hazlerigg et al, 2005).

Komunikace probíhá i mezi pravým a levým jádrem- prostřednictvím těsných spojení („tight junctions“) a GABA (Albus et al, 2005). Obě části jádra, tj. pravá a levá, mohou za určitých okolností fungovat jako samostatné jednotky (de la Iglesia et al, 2000). Při konstantním působení světla může dojít k jevu zvanému „rozštěpení“ (z angl. „splitting“) (de la Iglesia et al, 2000). Dojde při něm k rozštěpení jednotné denní periody v chování na dvě samostatné komponenty se vzájemným antifázovým vztahem. Zdá se, jako by aktivita byla řízena dvěma nezávislými oscilátory.

Analýza genové exprese ukázala, že dochází k funkčnímu střídání pravého a levého jádra. Každé z nich funguje jako samostatný oscilátor (de la Iglesia et al, 2000).

8.2 EXTERNÍ SYNCHRONIZACE SCN

Na vnitřní časový systém působí vnější podněty, které uzpůsobují periodu a fázi vnitřního oscilátoru své vlastní, seřizují jej tak, aby byl synchronizován s astronomickou délkou dne. Tyto stimuly jsou označovány jako synchronizátory. Synchronizátory mohou být světelné i nesvětelné, přičemž světlo je považováno za nejsilnější synchronizační signál. K přenastavení hodin světlem dochází jen v určité době, během subjektivní noci jedince, kdy světlo vyvolá fázové zpoždění (při osvětlení zvečera) či předběhnutí hodin (při osvětlení zrána). Odpověď oscilátoru se tedy liší v závislosti na době působení synchronizátoru a záleží také na jeho síle. Mezi nesvětelné synchronizátory patří například teplota, sociální kontakty a mateřské stimuly (Buhr et al, 2010; Viswanathan, 1999).

Ke světelné synchronizaci SCN dochází při změně fáze světelných podmínek, změně délky světlé části dne, tedy fotoperiody, případně i působením krátkých světelných pulzů. Informace o světle je do SCN zprostředkována přímou, monosynaptickou drahou vedoucí z retiny (Moore & Lenn, 1972). V retině se nacházejí kromě tyčinek a čípků ještě další specializované světločivé buňky, tvořící podskupinu retinálních gangliových buněk (RGCs z angl. „retinal ganglion cells“) a obsahující světločivý ftopigment melanopsin (Provencio et al, 2000). Cirkadiální hodiny v SCN nejsou synchronizovány světlem pouze v případě, kdy jsou vyřazeny z funkce všechny 3 typy fotoreceptivních buněk v retině, tj. tyčinky, čípky a melanopsin obsahující RGCs (Freedman et al, 1999). RGCs inervují kromě SCN i jiná mozková jádra (Berson et al, 2002). Axony RGCs tvoří retino-hypotalamický trakt (RHT) a vedou informace o světle přímo k VIPerním neuronům ve VL části SCN. Na terminálech RHT jsou po světelném pulzu uvolňovány neurotransmitter glutamát a neuromodulátory substance P a PACAP. Role glutamátu při synchronizaci byla testována *in vitro*, při jeho aplikaci na SCN řezy. V důsledku toho byla indukována transkripce *Per* genů stejně, jako je tomu po světelném pulzu (Nielsen et al, 2001). PACAP se podílí na světelné synchronizaci, má modulační funkci a zesiluje účinky glutamátu (Chen et al, 1999).

Glutamát se váže na NMDA a AMPA receptory ve VL části SCN a spouští kaskádu signálních drah, vedoucích k aktivaci transkripce hodinových Per genů a časných raných genů, jako je *c-fos*. Zkráceně tedy dochází k: depolarizaci membrány vylitím glutamátu, vstupu vápníku, aktivaci kináz, fosforylaci CREB, CREB vazbě na CRE, indukci transkripce genů. Změna v expresi těchto genů má za následek fázové posuny (Albrecht et al, 1997), tedy přenastavení vnitřních hodin. PACAP se váže, stejně jako VIP, na VPAC2 receptory ve VL části a může indukovat expresi Per genů nezávisle na mechanismu smyčky a může posilovat rytmicitu „core“. Z VL části je informace převáděna do rytmické DM části, kde dojde k přenastavení oscilátorů a z DM oblasti se pak informace šíří dál.

SCN jsou synchronizována nejen s denní dobou, ale také s délkou dne a mohou tak v organismu sloužit jako kalendář (Sumova et al, 1995). Mechanismus, jakým jsou SCN fotoperiodou modulována, není dosud zcela vyjasněn a souvisí se změnou fáze jednotlivých neuronů v rámci SCN (VanderLeest et al, 2007). Na dlouhé fotoperiodě je interval exprese hodinových genů v populaci neuronů v mediální části SCN významně delší než na krátké fotoperiodě (Sumova et al, 1995). Kromě toho, jak již bylo zmíněno, je pro reakci SCN na změnu fotoperiody důležitá i komunikace mezi populacemi neuronů v rostro-kaudálním rozložení. To bylo zkoumáno při pokusech s monitorováním exprese hodinových genů uvnitř SCN podél rostro-kaudální osy u Syrských křečků, chovaných v podmínkách simulujících dlouhou (16 hodin světlo, 8 tma), nebo krátkou fotoperiodu (8 hodin světlo, 16 tma). Rytická exprese byla zaznamenána jak v rostrální, tak kaudální části, nicméně s odlišným časem vrcholu (Hazlerigg et al, 2005). Při krátké fotoperiodě byla maxima v expresi synchronizována ve stejnou dobu jak v rostrální, tak kaudální části. Při dlouhé fotoperiodě bylo maximální exprese dosaženo v každé části v jinou dobu, tj. nejprve v kaudální, následně v mediální a nakonec v rostrální části (Hazlerigg et al, 2005). Díky tomuto rozložení maximální doby exprese mohou být celá SCN aktivní mnohem delší dobu, v závislosti na délce světlé části dne na dlouhé fotoperiodě. K podobným změnám ve fázi profilů exprese hodinových genů v rostrální a kaudální části SCN dochází i u laboratorního potkana, který není typicky fotoperiodickým zvířetem (Sosniyenko et al, 2009).

Informace o světle se k SCN mohou dostat i cestou nepřímou, přes genikulo-hypotalamický trakt (GHT) vedoucí z retino-recipientních jader v talamu, tzv. intergenikulárního listku (IGL z angl. „intergeniculate leaflet”), odkud vedou i informace o nesvětelných podnětech z jiných částí mozku (Pickard et al, 1987). Neurotransmitterem je neuropeptid Y (NPY). IGL umožňuje integraci světelných a nesvětelných signálů k seřizování SCN (MeyerBernstein & Morin, 1996).

Třetí důležitou drahou, přivádějící nesvětelné informace k SCN, je serotonergní dráha vedoucí z raphe jader (Moga & Moore, 1997).

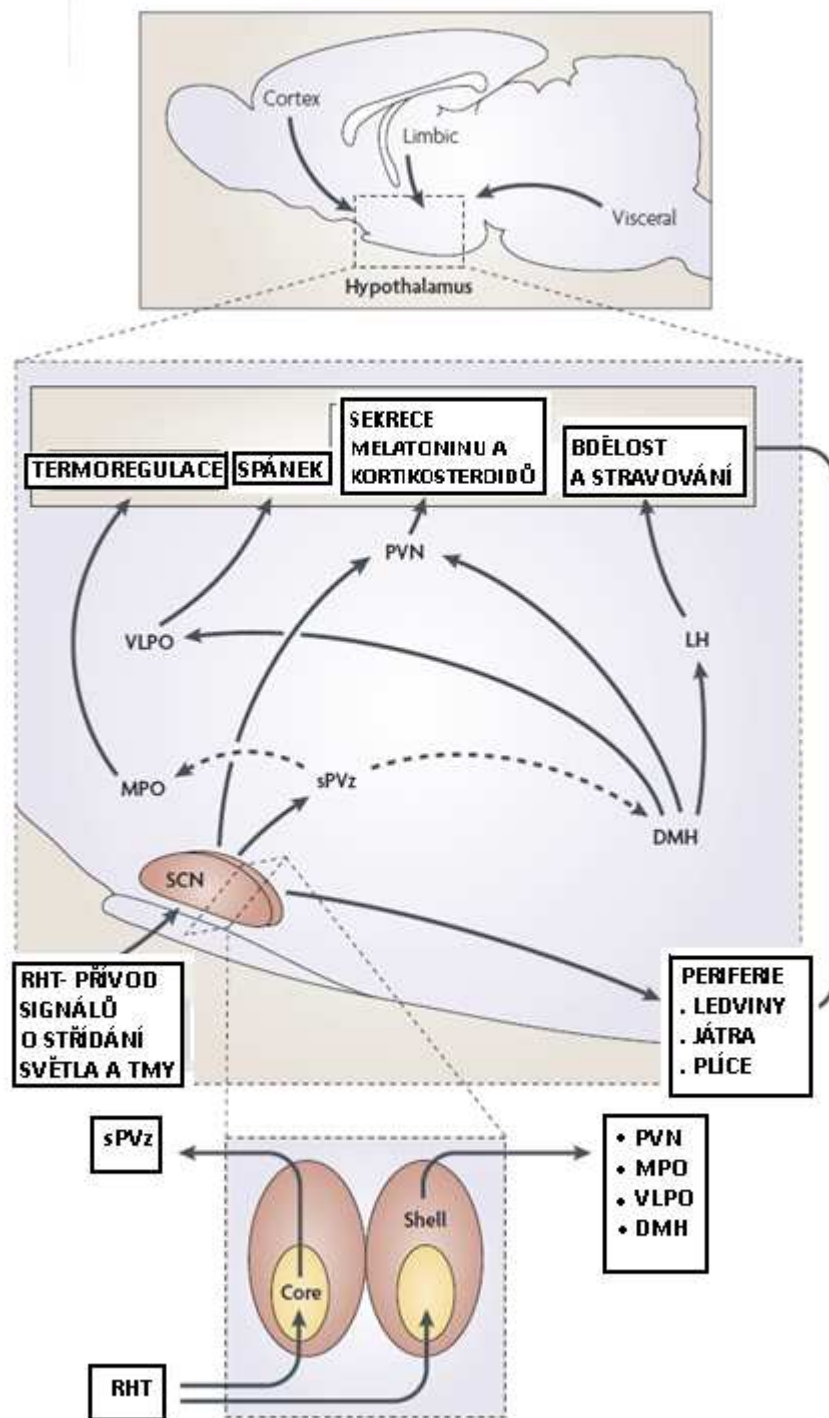
DM neurony přijímají aferentní dráhy z limbického systému, předního mozku a z některých dalších hypotalamických jader (Moga & Moore, 1997).

8.3 SYNCHRONIZACE OSCILÁTORŮ V TĚLE

K přizpůsobení celého organismu změnám vnějších podmínek jsou informace ze SCN předány dále do organismu, k jednotlivým tkáním a orgánům. SCN synchronizují další hodiny v mozku a periferních orgánech a také výstupní fyziologické rytmy, prostřednictvím neuronálních a humorálních výstupních drah a také nepřímo modulací tělesné teploty (Buhr et al, 2010). Většina výstupů vychází z DM části SCN (Leak et al, 1999). Periferní oscilátory jsou synchronizovány také na lokální úrovni synchronizačními faktory, které mohou být na SCN nezávislé (Damiola et al, 2000).

8.3.1 NEURONÁLNÍ VÝSTUPNÍ DRÁHY

Neuronální dráhy vedou do dalších regulačních oblastí mozku prostřednictvím preautonomních neuronů. Z DM části vedou spoje do DMH (dorzomediální hypotalamus), PVN (paraventriculární jádra hypotalamu), dále do talamu a limbických oblastí. Z VL části SCN míří výstup do subparaventriculární zony hypotalamu, což je přepojovací dráha do dalších mozkových center (Leak et al, 1999). (Viz schematický diagram na obrázku číslo 6.)

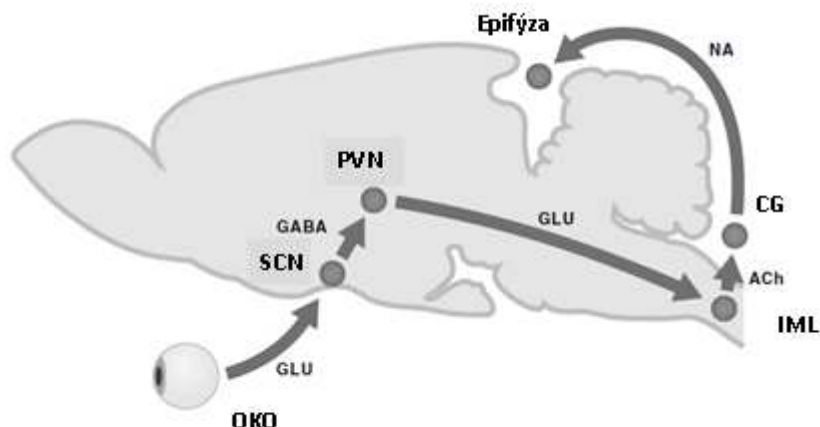


Obrázek číslo 6: Schematický diagram SCN a jeho vstupů a výstupů. (SCN- suprachiasmatická jádra, RHT- retinohypotalamický trakt, PVN- paraventriculární jádro hypotalamu, MPO- mediální preoptická oblast, VLPO- ventrolaterální preoptická oblast, DMH- dorzomediální hypotalamus, sPVz- subparaventriculární zona, LH- laterální hypotalamus) (Takahashi et al, 2008).

8.3.2 HUMORÁLNÍ VÝSTUPY

8.3.2.1 MELATONIN

Melatonin přenáší informace o denní a roční době do celého organismu. Jeho produkce je řízena ze SCN a vykazuje proto denní rytmus s vysokými hladinami v noci a nízkými hladinami přes den. Kromě toho je tvorba melatoninu akutně inhibována světlem (Klein & Moore, 1979). Díky této regulaci dochází při změně fotoperiody ke změně intervalu, kdy je hladina melatoninu vysoká (Illnerova & Vanecek, 1980). Melatonin se v těle váže na membránové receptory MT1, MT2 (i MT3) (Reppert et al, 1994), které se nachází v centrálním nervovém systému, včetně SCN, i v periferních orgánech (Pro přehled Hardeland et al, 2011). Je primárně syntetizován v epifýze, ale také v dalších tkáních jako např. v retině, kostní dřeni, střevě apod., kde má však pouze lokální účinky. Cirkadiánní rytmus v syntéze melatoninu je generován díky rytmu v aktivitě enzymu AA-NAT (Arylalkylamine N-acetyltransferasa), který je limitujícím enzymem v syntetické dráze přeměny melatoninu ze serotoninu (tryptofan → 5-hydroxy-tryptofan → serotonin → N-acetyl-5-hydroxy-tryptamin = melatonin). Je třeba zmínit, že mechanismy zapojené do řízení AA-NAT se liší mezidruhově. Například u ovce jsou změny aktivity AA-NAT regulovány primárně na úrovni proteinů, nikoli mRNA, jak je tomu například u hlodavců (Klein et al, 1997). Při odstranění SCN rytmus v hladině melatoninu vymizí. SCN a epifýza jsou propojeny polysynaptickou drahou: SCN- paraventriculární jádra hypotalamu- spinální mícha- cervikální ganglion- epifýza (Viz obrázek číslo 7.) (Foulkes et al, 1997; Moore, 1995).



Obrázek číslo 7: Polysynaptická dráha s příslušnými transmitery. (GLU- glutamát, SCN- suprachiasmatická jádra, GABA- γ - aminomáselná kyselina, PVN- paraventrikulární jádra hypotalamu, IML- intermediolaterální buňky spinální míchy, ACh- acetylcholin, CG- cervikální ganglion, NA- noradrenalin). Převzato z (Takahashi, 1994) a upraveno.

8.3.2.2 GLUKOKORTIKOIDY

Glukokortikoidní hormony ovlivňují různé fyziologické procesy v těle a chování, připravují organismus na stav aktivity. Rytmus v jejich uvolňování má funkci v synchronizaci periferních oscilátorů v těle (Pro přehled Balsalobre et al, 1998). Glukokortikoidy působí přes glukokortikoidní receptory, zastoupené ve většině periferních tkání a orgánů a v mnoha oblastech mozku. Jejich vylučování z kůry nadledvin je pod kontrolou SCN i samotných nadledvin, které mají funkci periferního oscilátoru. SCN zajišťuje denní rytmus v jejich sekreci přes autonomní nervový systém a přes hypotalamo-hypofyzární-nadledvinovou osu (Dickmeis, 2009).

9. ZÁVĚR

Cirkadiánní systém udává organismu vnitřní časový řád a umožňuje mu přizpůsobit se měnícím se podmínkám okolí a volit tak optimální životní strategii. U savců je hierarchicky uspořádán a na jeho vrcholu stojí suprachiasmatická jádra.

Suprachiasmatická jádra jsou výjimečnou mozkovou strukturou, která se u savců vysloveně specializovala na funkci cirkadiánních hodin. Jejich funkcí je generovat a udržovat cirkadiánní signál s periodou blízkou 24 hodinám, který přetrvává i v konstantních podmínkách. Dále koordinovat behaviorální a fyziologické procesy a synchronizovat ostatní oscilátory v mozku a v těle, pomocí přímých i nepřímých výstupních drah, a to jak mezi sebou, tak s měnícími se podmínkami okolí. Fázová rozmanitost uvnitř SCN umožňuje flexibilní, topograficky rozložené výstupní signály z různých podoblastí SCN, což umožňuje vysílat rozličné signály do odlišných oblastí mozku.

Cirkadiánní signál vzniká na úrovni jedné buňky a podstatou jeho vzniku jsou autoregulační transkripčně-translační zpětnovazebné smyčky, jichž se účastní sada hodinových genů a jejich proteinových produktů. Tento mechanismus je podobný jak v SCN, tak v periférii. Čím jsou tedy SCN výjimečná? Jednotlivé oscilující neurony jsou v SCN vzájemně propojeny důmyslnou komunikační sítí. Součástí této sítě jsou elektrické a chemické synapse. Za nejdůležitější komunikační prvek je považován vasoaktivní intestinální polypeptid. Díky těmto propojením dochází v SCN ke koordinaci rytmů jednotlivých neuronů, k synchronizaci a vzájemnému posilování buněčných oscilací. To vede ke zvýšení přesnosti a robustnosti rytmických výstupních signálů ze SCN, které organizují cirkadiánní rytmy v chování a fyziologii. SCN jsou také odolnější proti genetickým i jiným poruchám. Dochází v nich ke kompenzačním mechanismům, na nichž se podílí úplná, či částečná zastupitelnost hodinových genů jejich paralogy a již zmíněná mezibuněčná komunikace, jež může maskovat ztrátu funkce, která je zaznamenatelná na úrovni jednotlivých buněk. Jednotlivé oscilátory nikdy nemohou dosáhnout takové přesnosti, ani síly v generování cirkadiánních rytmů, jako SCN. Další specifickou vlastností SCN je jejich schopnost synchronizace s vnějším cyklem střídání dne a noci.

SCN jsou propojena s retinou, což jim umožňuje přijímat přímé světelné signály. Na popud světelných stimulů dochází v době subjektivní noci k přenastavení SCN, ta pak následně synchronizují i zbytek těla. SCN jsou synchronizována jak s denní dobou, tak s délkou dne, která se během roku mění, mohou tak sloužit organismu nejen jako hodiny, ale i jako kalendář. Všechny tyto vlastnosti předurčují SCN k jejich úloze centrálních hodin, stojících na vrcholu hierarchické organizace savčího cirkadiánního systému.

10. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abraham U, Prior JL, Granados-Fuentes D, Piwnica-Worms DR, Herzog ED (2005) Independent circadian oscillations of Period1 in specific brain areas in vivo and in vitro. *Journal of Neuroscience* **25**: 8620-8626

Abrahamson EE, Moore RY (2001) Suprachiasmatic nucleus in the mouse: retinal innervation, intrinsic organization and efferent projections. *Brain Research* **916**: 172-191

Aida R, Moriya T, Araki M, Akiyama M, Wada K, Wada E, Shibata S (2002) Gastrin-releasing peptide mediates photic entrainable signals to dorsal subsets of suprachiasmatic nucleus via induction of Period gene in mice. *Molecular Pharmacology* **61**: 26-34

Akashi M, Tsuchiya Y, Yoshino T, Nishida E (2002) Control of intracellular dynamics of mammalian period proteins by casein kinase I epsilon (CKI epsilon) and CKI delta in cultured cells. *Molecular and Cellular Biology* **22**: 1693-1703

Albrecht U, Sun ZS, Eichele G, Lee CC (1997) A differential response of two putative mammalian circadian regulators, mper1 and mper2, to light. *Cell* **91**: 1055-1064

Albus H, Vansteensel MJ, Michel S, Block GD, Meijer JH (2005) A GABAergic mechanism is necessary for coupling dissociable ventral and dorsal regional oscillators within the circadian clock. *Current Biology* **15**: 886-893

Aton SJ, Colwell CS, Harmar AJ, Waschek J, Herzog ED (2005) Vasoactive intestinal polypeptide mediates circadian rhythmicity and synchrony in mammalian clock neurons. *Nature Neuroscience* **8**: 476-483

Bae K, Jin X, Maywood ES, Hastings MH, Reppert SM, Weaver DR (2001) Differential Functions of mPer1, mPer2, and mPer3 in the SCN Circadian Clock. *Neuron* **30**: 525-536

Balsalobre A, Damiola F, Schibler U (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell* **93**: 929-937

Berson DM, Dunn FA, Takao M (2002) Phototransduction by retinal ganglion cells that set the circadian clock. *Science* **295**: 1070-1073

Brown TM, Colwell CS, Waschek JA, Piggins HD (2007) Disrupted neuronal activity rhythms in the suprachiasmatic nuclei of vasoactive intestinal polypeptide-deficient mice. *Journal of Neurophysiology* **97**: 2553-2558

Buhr ED, Yoo SH, Takahashi JS (2010) Temperature as a Universal Resetting Cue for Mammalian Circadian Oscillators. *Science* **330**: 379-385

Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, Simon MC, Takahashi JS, Bradfield CA (2000) Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell* **103**: 1009-1017

Cermakian N, Sassone-Corsi P (2000) Multilevel regulation of the circadian clock. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**: 59-67

Chen D, Buchanan GF, Ding JM, Hannibal J, Gillette MU (1999) Pituitary adenylyl cyclase-activating peptide: A pivotal modulator of glutamatergic regulation of the suprachiasmatic circadian clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 13468-13473

Colwell CS (2000) Rhythmic coupling among cells in the suprachiasmatic nucleus. *Journal of Neurobiology* **43**: 379-388

Damiola F, Le Minh N, Preitner N, Kornmann B, Fleury-Olela F, Schibler U (2000) Restricted feeding uncouples circadian oscillators in peripheral tissues from the central pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *Genes & Development* **14**: 2950-2961

de la Iglesia HO, Meyer J, Carpino A, Schwartz WJ (2000) Antiphase oscillation of the left and right suprachiasmatic nuclei. *Science* **290**: 799-801

DeBruyne JP, Weaver DR, Reppert SM (2007) CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neuroscience* **10**: 543-545

Dickmeis T (2009) Glucocorticoids and the circadian clock. *Journal of Endocrinology* **200**: 3-22

Dunlap JC (1999) Molecular Bases for Circadian Clocks. *Cell* **96**: 271-290

Foulkes NS, Sassone-Corsi P, Borjigin J, Snyder SH (1997) Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends in Neurosciences* **20**: 487-492

Freedman MS, Lucas RJ, Soni B, von Schantz M, Munoz M, David-Gray Z, Foster R (1999) Regulation of mammalian circadian behavior by non-rod, non-cone, ocular photoreceptors. *Science* **284**: 502-504

Guillaumond F, Dardente H, Giguere V, Cermakian N (2005) Differential control of Bmal1 circadian transcription by REV-ERB and ROR nuclear receptors. *Journal of Biological Rhythms* **20**: 391-403

Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR (2011) Melatonin-A pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Progress in Neurobiology* **93**: 350-384

Harmar AJ, Marston HM, Shen S, Spratt C, West KM, Sheward WJ, Morrison CF, Dorin JR, Piggins HD, Reubi J-C, Kelly JS, Maywood ES, Hastings MH (2002) The VPAC2 Receptor Is Essential for Circadian Function in the Mouse Suprachiasmatic Nuclei. *Cell* **109**: 497-508

Hazlerigg DG, Ebling FJP, Johnston JD (2005) Photoperiod differentially regulates gene expression rhythms in the rostral and caudal SCN. *Current Biology* **15**: R449-R450

Herzog ED, Aton SJ, Numano R, Sakaki Y, Tei H (2004) Temporal precision in the mammalian circadian system: A reliable clock from less reliable neurons. *Journal of Biological Rhythms* **19**: 35-46

Ibata Y, Okamura H, Tanaka M, Tamada Y, Hayashi S, Iijima N, Matsuda T, Munekawa K, Takamatsu T, Hisa Y, Shigeyoshi Y, Amaya F (1999) Functional morphology of the suprachiasmatic nucleus. *Frontiers in Neuroendocrinology* **20**: 241-268

Illnerova H, Vanecsek J (1980) Pineal rhythm in N-acetyltransferase activity in rats under different artificial photoperiods and in natural daylight in the course of a year. *Neuroendocrinology* **31**: 321-326

Inouye ST, Kawamura H (1979) Persistence of circadian rhythmicity in a mammalian hypothalamic island containing the suprachiasmatic nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 5962-5966

Klein DC, Coon SL, Roseboom PH, Weller JL, Bernard M, Gastel JA, Zatz M, Iuvone PM, Rodriguez IR, Begay V, Falcon J, Cahill GM, Cassone VM, Baler R (1997) The melatonin rhythm-generating enzyme: Molecular regulation of serotonin N-acetyltransferase in the pineal gland. *Recent Progress in Hormone Research, Proceedings of the 1996 Conference, Vol 52* **52**: 307-358

Klein DC, Moore RY (1979) Pineal N-acetyltransferase and hydroxyindole-o-methyltransferase - control by the retinohypothalamic tract and the suprachiasmatic nucleus. *Brain Research* **174**: 245-262

Ko CH, Takahashi JS (2006) Molecular components of the mammalian circadian clock. *Human Molecular Genetics* **15**: R271-R277

Ko CH, Yamada YR, Welsh DK, Buhr ED, Liu AC, Zhang EE, Ralph MR, Kay SA, Forger DB, Takahashi JS (2010) Emergence of Noise-Induced Oscillations in the Central Circadian Pacemaker. *Plos Biology* **8**

Leak RK, Card JP, Moore RY (1999) Suprachiasmatic pacemaker organization analyzed by viral transynaptic transport. *Brain Research* **819**: 23-32

Leak RK, Moore RY (2001) Topographic organization of suprachiasmatic nucleus projection neurons. *Journal of Comparative Neurology* **433**: 312-334

Lehman MN, Silver R, Gladstone WR, Kahn RM, Gibson M, Bittman EL (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant - immunocytochemical characterization of the graft and its integration with the host brain. *Journal of Neuroscience* **7**: 1626-1638

LeSauter J, Silver R (1999) Localization of a suprachiasmatic nucleus subregion regulating locomotor rhythmicity. *Journal of Neuroscience* **19**: 5574-5585

Levine JD, Weiss ML, Rosenwasser AM, Miselis RR (1991) Retino hypothalamic tract in the female albino-rat - A study using horseradish-peroxidase conjugated to cholera-toxin. *Journal of Comparative Neurology* **306**: 344-360

Liu AC, Welsh DK, Ko CH, Tran HG, Zhang EE, Priest AA, Buhr ED, Singer O, Meeker K, Verma IM, Doyle FJ, Takahashi JS, Kay SA (2007) Intercellular coupling confers robustness against mutations in the SCN circadian clock network. *Cell* **129**: 605-616

Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS (2000) Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation tau. *Science* **288**: 483-491

MeyerBernstein EL, Morin LP (1996) Differential serotonergic innervation of the suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet and its role in circadian rhythm modulation. *Journal of Neuroscience* **16**: 2097-2111

Moga MM, Moore RY (1997) Organization of neural inputs to the suprachiasmatic nucleus in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **389**: 508-534

Mohawk JA, Takahashi JS (2011) Cell autonomy and synchrony of suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *Trends in Neurosciences* **34**: 349-358

Moore RY (1995) Neural control of the pineal gland. *Behavioural Brain Research* **73**: 125-130

Moore RY (1996) Entrainment pathways and the functional organization of the circadian system. In *Hypothalamic Integration of Circadian Rhythms*, Buijs RM, Kalsbeek A, Romijn HJ, Pennartz CMA, Mirmiran M (eds), Vol. 111, pp 103-119.

Moore RY, Lenn NJ (1972) A retinohypothalamic projection in the rat. *Journal of Comparative Neurology* **146**: 1-14

Moore RY, Speh JC (1993) GABA is the principal neurotransmitter of the circadian system. *Neuroscience Letters* **150**: 112-116

Nagoshi E, Saini C, Bauer C, Laroche T, Naef F, Schibler U (2004) Circadian gene expression in individual fibroblasts: Cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells. *Cell* **119**: 693-705

Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J (2002) Vasoactive intestinal polypeptide induces per1 and per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus late at night. *European Journal of Neuroscience* **15**: 570-574

Nielsen HS, Hannibal J, Knudsen SM, Fahrenkrug J (2001) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces period1 and period2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus during late night. *Neuroscience* **103**: 433-441

Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB (2002) Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109**: 307-320

Pickard GE, Ralph MR, Menaker M (1987) The intergeniculate leaflet partially mediates effects of light on circadian rhythms. *Journal of biological rhythms* **2**: 35-56

Preitner N, Damiola F, Molina LL, Zakany J, Duboule D, Albrecht U, Schibler U (2002) The orphan nuclear receptor REV-ERB alpha controls circadian transcription within the positive limb of the mammalian circadian oscillator. *Cell* **110**: 251-260

Prolo LM, Takahashi JS, Herzog ED (2005) Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *Journal of Neuroscience* **25**: 404-408

Provencio I, Rodriguez IR, Jiang GS, Hayes WP, Moreira EF, Rollag MD (2000) A novel human opsin in the inner retina. *Journal of Neuroscience* **20**: 600-605

Ralph MR, Foster RG, Davis FC, Menaker M (1990) Transplanted suprachiasmatic nucleus determines circadian period. *Science* **247**: 975-978

Reppert SM, Weaver DR (2001) Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annual Review of Physiology* **63**: 647-676

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T (1994) Cloning and characterization of a mammalian melatonin receptor that mediates reproductive and circadian responses. *Neuron* **13**: 1177-1185

Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, Kume K, Lee CC, Van Der Horst GTJ, Hastings MH, Reppert SM (2000) Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* **288**: 1013-1019

Siepkka SM, Yoo SH, Park J, Song WM, Kumar V, Hu YN, Lee C, Takahashi JS (2007) Circadian mutant overtime reveals F-box protein FBXL3 regulation of cryptochrome and period gene expression. *Cell* **129**: 1011-1023

Sosniyenko S, Hut RA, Daan S, Sumova A (2009) Influence of photoperiod duration and light-dark transitions on entrainment of Per1 and Per2 gene and protein expression in subdivisions of the mouse suprachiasmatic nucleus. *European Journal of Neuroscience* **30**: 1802-1814

Sosniyenko S, Parkanova D, Illnerova H, Sladek M, Sumova A (2010) Different mechanisms of adjustment to a change of the photoperiod in the suprachiasmatic and liver circadian clocks. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* **298**: R959-R971

Stephan FK, Zucker I (1972) Circadian rhythms in drinking behavior and locomotor activity of rats are eliminated by hypothalamic

lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**: 1583-&

Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH, Weitz CJ (2002) Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature* **417**: 78-83

Sumova A, Travnickova Z, Peters R, Schwartz WJ, Illnerova H (1995) The rat suprachiasmatic nucleus is a clock for all seasons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**: 7754-7758

Takahashi JS (1994) Circadian Rhythms: ICER is nicer at night (sir!). *Current Biology* **4**: 165-168

Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, McDearmon EL (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder: implications for physiology and disease. *Nature Reviews Genetics* **9**: 764-775

Tamada Y, Tanaka M, Munekawa K, Hayashi S, Okamura H, Kubo T, Hisa Y, Ibata Y (1998) Neuron-glia interaction in the suprachiasmatic nucleus: A double labeling light and electron microscopic immunocytochemical study in the rat. *Brain Research Bulletin* **45**: 281-287

Tosini G, Menaker M (1996) Circadian rhythms in cultured mammalian retina. *Science* **272**: 419-421

VanderLeest HT, Houben T, Michel S, Deboer T, Albus H, Vansteensel MJ, Block GD, Meijer JH (2007) Seasonal encoding by the circadian pacemaker of the SCN. *Current Biology* **17**: 468-473

Viswanathan N (1999) Maternal entrainment in the circadian activity rhythm of laboratory mouse (C57BL/6J). *Physiology & Behavior* **68**: 157-162

Webb AB, Angelo N, Huettnner JE, Herzog ED (2009) Intrinsic, nondeterministic circadian rhythm generation in identified mammalian neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 16493-16498

Welsh DK (2005) Real-time reporting of circadian-regulated gene expression by luciferase imaging in plants and mammalian cells. *Circadian Rhythms* **393**: 269-288

Welsh DK, Logothetis DE, Meister M, Reppert SM (1995) Individual neurons dissociated from rat suprachiasmatic nucleus express independently phased circadian firing rhythms. *Neuron* **14**: 697-706

Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, Okamura H (2003) Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science* **302**: 1408-1412

Yamazaki S, Numano R, Abe M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakaki Y, Menaker M, Tei H (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science* **288**: 682-685

Yan L (2009) Expression of clock genes in the suprachiasmatic nucleus: Effect of environmental lighting conditions. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* **10**: 301-310

Yan L, Takekida S, Shigeyoshi Y, Okamura H (1999) Per1 and Per2 gene expression in the rat suprachiasmatic nucleus: Circadian profile and the compartment-specific response to light. *Neuroscience* **94**: 141-150

Yoo SH, Yamazaki S, Lowrey PL, Shimomura K, Ko CH, Buhr ED, Slepka SM, Hong HK, Oh WJ, Yoo OJ, Menaker M, Takahashi JS (2004) PERIOD2 :: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 5339-5346

Sekundární citace (označená symbolem *):

*Klein DC, Moore RY, Reppert SM, ed. (1991). *Suprachiasmatic Nucleus: The Mind's Clock*. New York: Oxford Univ. Press